

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: 10332687 A

(43) Date of publication of application: 18 . 12 . 98

(51) Int. Cl

G01N 33/48

C12Q 1/04

C12Q 1/68

G01N 33/50

(21) Application number: 09139880

(22) Date of filing: 29 . 05 . 97

(71) Applicant: FUJIREBIO INC OOBEKUSU KK

(72) Inventor: SUMIYA MASAMI
SAKUTA RYUTARO
KANAI MASAHIRO

(54) METHOD AND DEVICE FOR CAPTURING
SPECIFIC SUBSTANCE CONTAINED IN LIQUID
AND METHOD FOR DETECTING THE SPECIFIC
SUBSTANCE UTILIZING THE METHOD

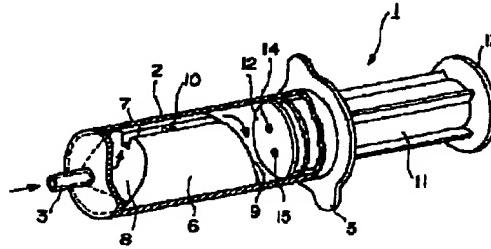
causing a catalytic reaction between the captured specific substance and a labeling substance.

COPYRIGHT: (C)1998,JPO

(57) Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method and device by which a specific substance contained in a liquid can be captured surely even when the quantity of the substance is very small and used after concentration or amplification and a method for detecting the specific substance utilizing the capturing method.

SOLUTION: A capturing device 1 is composed of a cylinder member 2 having an opening 3 for supplying and/or discharging a liquid, a plunger member 11 which slidably moves on the inner peripheral surface of the member 2, a guide member 6 which is communicated with the opening 3 and can form a liquid passage 7 having a very small cross section together with the inner peripheral surface of the member 2, and a capturing member 10 which is positioned in the passage 7 and carries a coupling material for capturing a specific substance contained in the liquid by coupling, surely captures the specific substance by bringing the liquid into contact with the capturing member 10 even when the quantity of the substance is very small, and detects and measures the substance by forming a labeled matter by



(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平10-332687

(43)公開日 平成10年(1998)12月18日

(51) Int.Cl.⁶
G 0 1 N 33/48
C 1 2 Q 1/04
1/68
G 0 1 N 33/50

識別記号

F I
G 0 1 N 33/48
C 1 2 Q 1/04
1/68
G 0 1 N 33/50

A

審査請求 未請求 請求項の数9 OL (全8頁)

(21)出願番号 特願平9-139880

(22)出願日 平成9年(1997)5月29日

(71)出願人 000237204

富士レビオ株式会社
東京都中央区日本橋浜町2丁目62番5号

(71)出願人 000103600

オーベクス株式会社
東京都墨田区業平5丁目1番12号

(72)発明者 角谷 雅實

東京都中央区日本橋浜町2丁目62番5号
富士レビオ株式会社内

(72)発明者 作田 隆太郎

東京都墨田区業平5丁目1番12号 オーベ
クス株式会社内

(74)代理人 弁理士 幸田 全弘

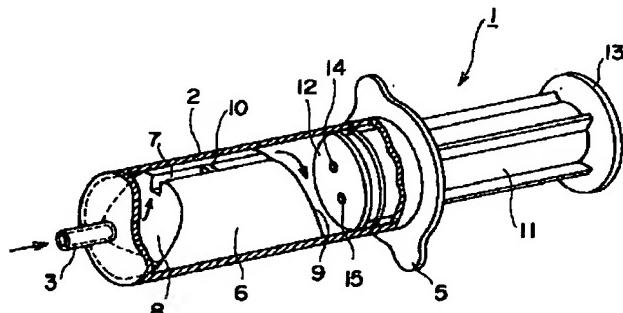
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 液中に含まれる特定物質の捕捉方法とその装置並びに該捕捉方法を利用した特定物質の検出方法

(57)【要約】

【課題】 液中に含まれた極微量の特定物質をも確実に捕捉して濃縮又は增幅して使用できる捕捉方法とその装置、並びに該捕捉方法を利用した特定物質の検出方法を提供する。

【解決手段】 液体を供給又は／及び排出するための開口部3を備えたシリンダ部材2と、該シリンダ部材2の内周壁に沿って摺接移動するプランジャー部材11と、前記開口部3と連通し、かつシリンダ部材2の内周壁との間に微小断面の液通路7を形成しうるガイド部材6と、該液通路7内に配置され液中の特定物質を結合させて捕捉するための結合物質を担持させた捕捉部材10とで捕捉装置1を構成し、前記捕捉部材10に液を接触させることによって液中に存在する特定物質が微量であってもこれを確実に捕捉し、捕捉した特定物質と標識物質とを接触反応させることによって標識物を形成させて検出測定する。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 微小の断面で構成された液通路内に液体を強制的に流通させることによって該液通路内に配置した捕捉部材と接触させ、該捕捉部材に液中の特定物質を結合させて捕捉することを特徴とする液中に含まれる特定物質の捕捉方法。

【請求項2】 前記液通路への液体の強制的な流通は、前記液通路内に設けた捕捉部材に液体を一回通過させることによって行うことを特徴とする請求項1に記載の捕捉方法。

【請求項3】 前記液通路への液体の強制的な流通は、前記液通路内に設けた捕捉部材に液体を繰り返し通過させることによって行うことを特徴とする請求項1に記載の捕捉方法。

【請求項4】 前記捕捉部材は、捕捉せんとする物質と結合する抗体又は抗原、もしくは核酸を担持させたものであることを特徴とする請求項1に記載の捕捉方法。

【請求項5】 液体を供給又は／及び排出するための開口部を備えたシリンダ部材と、該シリンダ部材の内周壁に沿って摺接移動するプランジャー部材と、前記開口部と連通し、かつシリンダ部材の内周壁との間に微小断面の液通路を形成しうるガイド部材と、該液通路内に配置され液中の特定物質を結合させて捕捉するための結合物質を担持させた捕捉部材とからなることを特徴とする特定物質の捕捉装置。

【請求項6】 前記プランジャーは、前記シリンダ部材内の液体と隔離されて無接触の状態で作動するものであることを特徴とする請求項5に記載の捕捉装置。

【請求項7】 前記捕捉部材は、前記シリンダ部材内に形成される液通路に所要の間隔を存して複数配置され、液中から異なった特定物質を捕捉できるようそれぞれ担持する物質が異なったものであることを特徴とする請求項5に記載の捕捉装置。

【請求項8】 微小の断面で構成された液通路内に液体を強制的に流通させることによって該液通路内に配置した捕捉部材と接触させ、該捕捉部材に液中の特定物質を結合させて捕捉したのち、前記捕捉部材に捕捉した特定物質と、当該特定物質と結合する標識物質とを反応させることを特徴とする液中の特定物質の検出方法。

【請求項9】 前記特定物質の捕捉は、液体を捕捉部材に強制的に流通させて捕捉部材に目的とする特定物質を結合させたのち、該捕捉部材を洗浄し、さらに捕捉部材に標識物質を接触させて複合体を形成せしめ、捕捉部材の洗浄後、捕捉部材に結合した標識物を検出することを特徴とする請求項8記載の液中の特定物質の検出方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】この発明は、液中に含まれる特定物質を効率的に捕捉することのできる捕捉方法と、該捕捉方法に使用する捕捉装置、ならびに該捕捉方法を

利用した特定物質の検出方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】たとえば、ウイルス(HIV)などの遺伝子や、O-157大腸菌のように空気感染するような有毒細菌、さらには生体中の微量抗原又は抗体などの検出は、一般的には液中にこれら特定物質が微量でも含まれていればこれを確実に捕捉することが前提条件となる。

【0003】この捕捉に際し、検体中に数百個のウイルスや細菌などの特定物質が存在すれば、従来の捕捉方法によって特定物質の測定を実施することができ、さらに必要により、たとえば核酸をポリメラーゼ鎖鎖反応(P-C-R)法によって増殖する方法、細菌を培養する方法などにより増幅して測定することもできる。ところが、検体中に含まれる特定物質の個数の少ない場合には、特定物質を拾い落とすことなく捕捉することがきわめて難しい。この場合には、検体量を増やし、ウイルスや細菌などの特定物質を確実に捕捉してから増幅する方法が考えられるが、捕捉には多大な労力と時間とを必要としていた。

【0004】一方、生体などに存在する物質の存在を確認するには、検体中の抗原又は抗体を免疫測定する方法が知られている。かかる抗原抗体反応で検出測定される物質は、おむね 1 fmol c/m1 以上の濃度である。しかしながら、これ以下の極微量、たとえば、 1 p (ピコ) g/m1 以下の濃度で分子量 30000 程度の均一に分散している特定物質の $10 \mu\text{l}$ 中での分子数が約 20 万個というような場合には、実用上その存在の確認が困難になる場合が多い。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】遺伝子や有毒細菌などの特定物質の捕捉は、きわめて効率的な手段を要求されるので、公知の手段では満足のゆく結果を得ることが難しく、ウイルス遺伝子や細菌を含む使用検体の量が限られるため、確実な捕捉がきわめて困難で、捕捉できたとしても時間を要し、検体を処理することなく不純物が混在した状態で検査に供されることから精度を向上させることができないのが現状である。

【0006】他方、生体中の極微量の特定物質確認の際に生ずる物理的な障害としては、反応速度と計測速度の減少と、非特異物質の物理的排除の困難性が挙げられる。より具体的に述べると、反応自体が攪拌律速になるため、通常の条件では反応の場に目的物が接近し結合するために時間が掛りすぎたり、反応の場が広いと目的物との結合効率が低く、測定に時間が掛かったる。さらに、検体の使用量を多くしても反応速度に多くの期待ができるなどといった物理的要因が考えられる。

【0007】また、生化学的な障害としては、非特異的反応を効率的に除去(洗浄)できないこと、捕捉部位の表面積を広くすると検出感度が低下すること、一個の抗

体や遺伝子では識別能力に限界りクロスコンタミネーションの増加などによって非特異性が上昇することなどが挙げられる。そこで、これらの障害要因を打破した検出技術の確立が望まれている。

【0008】この発明はかかる現状に鑑み、液中に特定物質が微量でも含まれていれば、当該特定物質を確実に捕捉して濃縮又は増幅して使用することができる液中の特定物質の捕捉方法とその装置を提供することを目的とするものである。

【0009】この発明の他の目的は、前記の捕捉方法を利用して生体などから得られる検体中にごく微量でも検出すべき物質が含まれていれば、これを確実に捕捉し、高感度、迅速な計測と迅速な反応、使用する試薬の減少化、特異性の向上ができ、かつ簡便に自動化に対処することが可能な検体の検出方法を提供せんとすることである。

【0010】

【課題を解決するための手段】この目的を達成するため、この発明の請求項1に記載の発明は、微小の断面で構成された液通路内に液体を強制的に流通させることによって該液通路内に配置した捕捉部材と接触させ、該捕捉部材に液中の特定物質を結合させて捕捉することを特徴とする液中に含まれる特定物質の捕捉方法である。

【0011】この発明の請求項5に記載の発明は、液体を供給又は／及び排出するための開口部を備えたシリング部材と、該シリング部材の内周壁に沿って摺接移動するプランジャー部材と、前記開口部と連通し、かつシリング部材の内周壁との間に微小断面の液通路を形成しうるガイド部材と、該液通路内に配置され液中の特定物質を捕捉するための物質を担持させた捕捉部材とからなることを特徴とする特定物質の捕捉装置である。

【0012】さらに、この発明の請求項8に記載の発明は、微小の断面で構成された液通路内に液体を強制的に流通させることによって該液通路内に配置した捕捉部材と接触させ、該捕捉部材に液中の特定物質を結合させて捕捉したのち、前記捕捉部材に捕捉した特定物質と、当該特定物質と結合する標識物質とを反応させることを特徴とする液中の特定物質の検出方法である。

【0013】

【発明の実施の形態】この発明の液中の特定物質の捕捉方法は、液体を微小断面で構成された液通路内に強制的に流通させ、該液通路内に配置した捕捉部材で液中に微量でも特定物質が存在しているとこれを確実に捕捉するものである。

【0014】特定物質を含む液体を流通させるための液通路は、たとえば、幅と深さが共におよそ5mm、好ましくは1mm以下の凹溝で構成された微小の断面を有し、この液通路内に特定物質を結合捕捉することができる捕捉部材が装着される。この捕捉部材は特定物質を捕捉、濃縮したり、捕捉部材と共に既存の増幅法や培養法

に適用することができる。

【0015】かかる捕捉部材としては、たとえば、セルロース、ニトロセルロース、グラスウールなどの濾紙として用いられる紙濾材の成形体、微細孔を有するプラスチック、ガラス、セラミック、シリコンなどの成形体などが好適に使用される。

【0016】この捕捉部材は、液中に含まれている特定物質と結合することのできる結合物質、たとえば抗体又は抗原、DNAやRNAなどの核酸を担持させたもので、前記の液通路内に少なくとも1個を装着するものである。これら物質を捕捉部材に担持させる方法としては、公知の物質吸着法や化学結合法などを挙げることができるが、担持手段については特段の制限はない。

【0017】液通路内に装着する捕捉部材は基本的には1個であるが、複数設けることもできる。複数の捕捉部材を液通路内に配置する場合には、各捕捉部材を所定の間隔で設け、各捕捉部材には異なった特定物質を捕捉又は検出することができるよう異なった結合物質を担持させることができるものである。また、1個の捕捉部材に、2以上の前記結合物質を混合もしくは単独に担持させてもよい。

【0018】前記の担持させた結合物質によって捕捉部材に結合させた特定物質は、結合した特定物質と結合する標識された抗原、抗体、DNA、RNAなどの標識物質と反応させ、たとえば、免疫複合体又は2本鎖の核酸、を形成させて標識物を測定するものである。

【0019】標識に用いる標識物としては、たとえば、色素を含む着色粒子、蛍光粒子、化学発光粒子、化学発光物質（アクリジニウムエステル、イソルミノールなど）、酵素、放射性同位元素（RI）などを挙げることができる。中でも前記の化学発光粒子、化学発光物質などは高感度測定を簡便に行うためには好ましい物質である。

【0020】この発明の捕捉方法や、該捕捉方法を利用した検出方法は、液中に含まれる各種の抗原、抗体、核酸などを捕捉したり、測定（検出）することによって、たとえば、ウイルスや細菌などによる感染症の早期発見や、生体新規微量物質の定量と臨床研究への応用、癌の早期発見、癌移転因子、老化因子、新規インターフェロンなどの生体機能検査、毒素の検出や脳内微量物質の定量と機能分析、心臓や脳などの血管異常の早期診断、さらには感染症や癌に対する防御機能検査、薬剤の含有検査、PCR法を利用した高感度遺伝子診断、遺伝子工学より産生が予想される物質の特定や新規診断薬の発見などきわめて広い用途に利用することができる。

【0021】かかる捕捉方法に使用する捕捉装置は、特定物質を含む液（検体液）を供給又は／及び排出するための開口部を有するシリング部材と、該シリング部材内に液を強制的に流通させるためのプランジャーと、前記開口部と連通し、かつシリング部材の内周壁との間に微

小断面の液通路を形成しうるガイド部材と、該液通路内に配置され液中の特定物質を捕捉するための結合物質を担持させた捕捉部材とからなることから構成される。

【0022】捕捉装置を構成するシリンダ部材は、ガラス又はプラスチック製の所要の径と長さを有する円筒状パイプから形成るもので、プランジャーを受け入れるための挿入部と、捕捉又は検出せんとする特定物質を含む液をシリンダ部材に供給し、シリンダ部材から排出するための開口部を内外に連通するよう形成したもので、内部が目視できるよう所要の部位又は全体を透明とすることが好ましい。前記開口部近傍の内部には、液を液通路に強制的に導くためのガイド部材が装填される。

【0023】このガイド部材は、外形が前記シリンダ部材の内形と密着する形状を有する所要長さの中実体からなるもので、外周の一部に長手方向に沿って一端面から他端面に達する所要の幅と深さを有する凹溝を形成して液通路としている。この液通路は、特定物質を含む液が少ない量であっても、液中に含まれる物質（検体）を確実に捕捉することが可能となるように、断面を幅と深さの狭い微小としたもので、5mm四方以下、好ましくは1mm四方以下とすることが望ましい。

【0024】前記ガイド部材の材質には特段の制限はないが、プラスチックでシリンダ部材の内形と密着する外形の中実体を成型し、得た中実体の表面をコーティング処理して捕捉又は測定に使用する液が内部に浸透しないようにしたものである。また、このガイド部材は、使用する液をスムーズに液通路内に供給することができ、前記捕捉部材に数回液を接触させたり、あるいは排出するに際しても、シリンダ部材内に滞留することがないよう、ガイド部材の両端面部を液通路方向に傾斜させてテープ一面を形成することが好ましい。

【0025】前記シリンダ部材の内周壁と前記ガイド部材の凹溝との間に形成される液通路内には、先に述べたように使用する液中に含まれる物質を捕捉するための捕捉部材が設けられる。

【0026】前記プランジャーは、前記シリンダ部材の内形と密接する頭部を有する所要の長さの中実体からなるもので、該頭部の外周にはシリンダ部材の内周壁との密接をより確実にするためのOリングなどを装着することが好ましい。また、このプランジャーには、液中の特定物質を捕捉した捕捉部材を洗浄するための洗浄液通路と、捕捉した特定物質を検出するための標識液を捕捉部材に供給するための標識液通路を形成しておけば、特定物質を捕捉した捕捉部材をその都度ガイド部材から取り外すことなく、その場において特定物質の有無を確認することもできる。なお、この洗浄液通路と標識液通路は必ずしもプランジャーに設ける必要はなく、前記シリンダ部材に設けてよい。

【0027】かかる構成からなる捕捉装置を使用して特定物質を捕捉又は検出するには、シリンダ部材に設けた

ノズルなどからなる開口部を通じてシリンダ部材内に液を供給し、プランジャーを操作して液をガイド部材の凹溝とシリンダ部材の内周壁との間に形成された液通路内に強制的に導き、液を液通路内に装着された捕捉部材と接触させ、液中の特定物質を捕捉部材に担持させた結合物質と結合させることによって行うものである。

【0028】液と捕捉部材との接触に際しては、その接觸時間を調整するため、プランジャーの移動速度を調節して液を強制的に流通させることができる。すなわち、この発明においては、捕捉を確実に行い得る液量を強制的に流通させるために、従来のクロマト法やろ過法に比べ接觸時間を選択でき、捕捉部材への結合を効率よく行うことができる。

【0029】捕捉部材と液との接觸は基本的には1回でも効率よく行うことができるが、さらに精度と感度とを向上させるためには2回以上の通過を繰り返して接觸させることが好ましい。この操作によって、検体の液量及び捕捉部材の量に応じて最適な捕捉を行うことができる。

【0030】捕捉部材に結合した物質には、検体中の特定物質と共に非特異物質が存在する場合がある。したがって、この非特異物質を捕捉部材から除去するために、前記洗浄液通路から洗浄液を液通路内に供給し洗浄を行うことができる。この洗浄法によれば、洗浄液を捕捉部材の存在する液通路内に一方向に通過させるため、効率よく捕捉部材を洗浄することができる。さらに、非特異物質が結合する弱い結合を排除し、除去するためには、捕捉部材の近傍に超音波、電磁波などの外部から加えたエネルギーによる選択的な除去手段を追加することもできる。

【0031】かくして捕捉部材に捕捉した特定物質は、捕捉部材と共に既存の増幅法や培養法に適用したり、捕捉部材上で捕捉した特定物質と結合する標識された標識物質（抗原又は抗体、核酸など）と反応させて標識物質を生成させることによって測定（検出）するものである。

【0032】なお、この発明の捕捉装置は基本的には手動で行うものであるが、たとえば、ガイド部材を内蔵したシリンダ部材を適宜手段によって鉛直に保持した状態で、該シリンダ部材内に開口部を通じて特定物質を含んだ液の供給工程、シリンダ部材内に供給された液を強制的に捕捉部材に接觸させる工程、その後洗浄工程などの一連の工程をコンピュータ制御によって自動化することもできる。

【0033】

【作用】この発明の液中の特定物質の捕捉方法は、微小な断面で構成された液通路内に特定物質を含む液を強制的に流通させ、該液通路内に配置した捕捉部材で液中の $\mu\text{g}/\text{mL} \sim \text{pg}/\text{mL}$ の濃度範囲、特に $1\text{pg}/\text{mL}$ 以下の微量に存在する特定物質をも高感度的確に捕捉することができる。

【0034】前記の方法に使用する捕捉装置は、シリング部材内にガイド部材を装填し、該ガイド部材に形成された凹溝とシリング部材の内周壁との間で液通路を形成し、この液通路内に捕捉部材を装着し、プランジャーの操作で液を捕捉部材に強制的に接触させると、捕捉部材には捕捉せんとする特定物質と結合する結合物質を担持させているので、確実に目的の特定物質を捕捉することができる。

【0035】この発明の前記捕捉方法を利用した特定物質の検出方法は、捕捉部材に捕捉した特定物質と結合する標識された標識物質を捕捉部材上において反応させて標識物を検出することによって、高感度で特定物質の存在の有無を確認することができる。

【0036】

【実施例】以下、この発明の液中の特定物質の捕捉方法と、該捕捉方法に使用する捕捉装置と、該捕捉方法を利用した特定物質の検出方法の実施例を添付の図面を引用して具体的に説明する。この発明において、液中の特定物質を捕捉するための捕捉装置1は、所要の径と長さを有する円筒状のシリング部材2と、該シリング部材2内に装填されるガイド部材6と、該ガイド部材6に着脱自在に装着可能な捕捉部材10と、前記シリング部材2内を摺接移動するプランジャー11とから構成されている。

【0037】図1に示すシリング部材2は全体が透明なプラスチックの成形体で構成したもので、一端面が閉塞されると共に、他端面が開口され、前記閉塞された端面の中央部に検体液を吸引採取するための小径のノズル3がシリング部材2内と連通するよう突出形成されると共に、他端開口部の外周に沿って指で掛止するためのフランジ5が一体的に形成され、当該開口部をプランジャー11の挿入部4としたものである。

【0038】プランジャー11は同じくプラスチック製で、シリング部材2の内径よりも径が小さく、所要の長さを有する中実体の先端部に外周部にOリング12を装着した頭部12を一体的に形成すると共に、基端部に指掛け用のフランジ13を一体的に形成したもので、前記頭部12は前記シリング部材2の内周壁と気密に摺接して移動するものである。

【0039】このプランジャー11には基端部から頭部12に開口する2本の通路を内部に形成され、一方の通路を洗浄液を流通させる洗浄液通路14とし、他方の通路を標識物質を含む標識液を流通させる標識液通路15としている。

【0040】前記ノズル3に近接するシリング部材2の内部には、シリング部材2の内周壁と密着する所要長さの中実体の外周部に軸方向に沿って1mm×1mmの幅と深さとを有する凹溝を形成したガイド部材6が可動不可の状態で装填され、シリング部材2の内周壁との間に微小な断面積の液通路7を形成している。

【0041】このガイド部材6はプラスチック製で、内 50

部に検体液が浸透することがないよう表面をコーティング処理したもので、ノズル3側に位置する端面は少なくともその半分がシリング部材2の他端側に傾斜するテーパー面8を形成し、開口側に位置する端面はノズル3側に傾斜するテーパー面9を形成しているので、液通路7の始端側はテーパー面8を介してノズル3と連通し、終端側はテーパー面9を介してシリング部材2内と連通している。したがって、検体液の吸い上げに際してはノズル3からの検体液がスムーズに液通路7に導かれ、また吐出される場合には、検体液が液流通路7からテーパー面8に沿ってノズル3側に流れるため検体液がシリング部材2内に滞留することがないものである。

【0042】前記シリング部材2の内周壁と前記ガイド部材6で形成される微小な断面の液通路7内には、堰板状の捕捉部材10が装着されている。この捕捉部材10は滤紙として使用される滤材の成形体からなる液透過性のもので、接触する検体液中に含まれる特定物質(検体)を確実に捕捉するため、この捕捉部材10には捕捉又は検出せんとする特定物質と結合することのできる結合物質、たとえば抗原や抗体、あるいは核酸を公知の担持手段によって担持させている。

【0043】かくする捕捉装置1による特定物質の捕捉は、以下の要領によって行う。まず、捕捉装置1のシリング部材2におけるノズル3を容器(図示せず)に収容した検体液中に浸し、プランジャー11を引き上げるように操作して検体液を吸い上げると、検体液は図2に示す矢印のとおりノズル3→ガイド部材6のテーパー面8とシリング部材2の内周壁との間に形成された空隙部X→液通路7→ガイド部材6後方のシリング部材2の空隙部Yに強制的に流れ、その間に検体液は液通路7に装着した捕捉部材10と接する。ついで、プランジャー11を押し下げて、前記空隙部Yにある検体液を再び液通路7→空隙部X→ノズル3を介し容器に戻す操作を行うもので、捕捉部材10への検体液の接触は少なくとも1度、好ましくは数回接触させる。その際、プランジャー11に設けた洗浄液通路14と標識液通路15は閉状態を保持している。

【0044】捕捉部材10への検体液の接触処理操作が終了すると、検体液をシリング部材2から完全に排出したのち、プランジャー11の洗浄液通路14から洗浄液をシリング部材2内に流し、液通路7内を洗浄し捕捉部材10に捕捉された不要な物質を除去する。この時、捕捉部材10には捕捉しようとする特定物質と結合する結合物質があらかじめ担持されているので、液中の特定物質は結合物質と結合して捕捉部材10に捕捉されているので、捕捉部材10から洗い流されるおそれは全くない。

【0045】かくして、液中に含まれる特定物質は捕捉部材10によって確実に捕捉、濃縮することができるので、これを捕捉部材と共に既存の増幅法や培養法に使用することができる。

【0046】かかる捕捉装置1を使用して液中の特定物質を検出するには、捕捉部材10に特定物質を捕捉し、洗浄工程までは同一の処理を実施する。しかるのち、標識された標識物質を含む標識液を標識液通路15を使用してシリンダ部材2内に注入して標識液と捕捉部材10とを接触させる。この標識液は、捕捉部材10に捕捉された特定物質と結合する標識された抗原や抗体又は核酸からなるもので、捕捉部材10と接触することによって捕捉部材10に結合された特定物質と反応して、たとえば、免疫複合体もしくは2本鎖の核酸を形成する。

【0047】標識物質と捕捉部材10に結合された特定物質とを反応させて結合させると、標識液を排出して洗浄剤を再びシリンダ部材2内に注入して洗浄したのち、捕捉部材10に形成された免疫複合体もしくは2本鎖の核酸の標識物を目視又はCCDカメラなどで測定することによって液中に含まれる特定物質を検出(測定)するものである。

【0048】しかして、たとえば、検体を唾液とし、該唾液中に含まれるHIV抗原が含まれているか否かを検出する場合には、捕捉部材に抗HIV抗体を担持させ、標識抗体として前記抗HIV抗体とは異なるHIV抗原決定基を有し標識された抗HIV抗体からなる標識液を接触させることによって、検出のための複合体を形成することができる。

【0049】また、この実施例においては、プランジャー11に洗浄液通路14と標識液通路15を形成し、該洗浄液通路14と標識液通路15を利用して洗浄処理と複合体形成処理を行っているが、プランジャー11にかかる液通路を形成せず、ノズル3から洗浄液と標識液を吸い上げて実施例と同様の処理をしてもよいことは当然のことである。

【0050】図3に示す捕捉装置21は、基本的には前記の実施例と同様にノズル23を有するシリンダ部材22とプランジャー26とから構成されたもので、シリンダ22部材の前記ノズル23に近い内部にはガイド部材24が装填固定され、ガイド部材24に形成した凹溝と前記シリンダ部材22の内周壁との間に微小な断面積の液通路25を形成したものである。

【0051】この捕捉装置21の液通路25には、3個の堰板状の捕捉部材20a, 20bおよび20cが所定間隔を保持して装着されている。これら捕捉材20a, 20b及び20cには、検体液中の異なった種類の特定物質を検出するための抗原又は抗体がそれぞれ担持させているので、一度の操作によって同時に検体中の複数の特定物質を確認することができる。

【0052】図4に示す捕捉装置31は、前記の各実施例と同様にノズル33を有するシリンダ部材32と、該シリンダ部材32内を摺接移動するプランジャー34と、前記シリンダ部材32内に装填されるガイド部材35とから構成され、シリンダ部材32の内周壁とガイド

部材35に形成された凹溝との間に液通路36を形成すると共に、該液通路36内に検出せんとする特定物質と結合する物質を担持させた捕捉部材37を装着したもので、前記各実施例と異なる点は、シリンダ部材42の開口部の近傍に洗浄液を供給するための洗浄液通路38と標識物質を供給するための標識液通路39を形成したもので、ノズル33から検体液を吸い上げる場合には、これら各液通路は閉鎖されて内部を真空に保持するもので、自動化に適した装置である。

10 【0053】図5に示す捕捉装置41は自動検出のためのもので、シリンダ部材42の底部には液排出用の弁を有する開口部43が、上部には液供給用の弁を有する開口部44がそれぞれ設けられているので、開口部43の弁を開いて開口部44の弁を開いてシリンダ部材42内に検体液を供給したのち、開口部44の弁を閉じてプランジャー45を上下動させると、検体液はガイド部材46とシリンダ部材42の内周壁との間に形成された微小断面の液通路47を介してガイド部材46の下方のシリンダ部材42の底部とガイド部材46の上部のシリンダ部材42内を往復移動する。この往復移動の際、検体液が液通路47に装着された捕捉部材48と接触し、液中の特定物質が捕捉部材48にキャッチされる。

20 【0054】捕捉部材48と検体液を度数強制的に接触させたのちは、開口部43の弁を開いて検体液をシリンダ部材42から排出し、弁を開放した状態で洗浄液S₁をプランジャー45内に形成した経路を通じてシリンダ部材42内に供給してシリンダ部材42内と捕捉部材48を洗浄する。ついで、標識液S₂を同様にシリンダ部材42内に供給し、標識液を捕捉部材48とを接触させて複合体を形成させたのち、標識液の排出、洗浄剤S₁の注入による洗浄を行ったのち、CCDカメラ49によって捕捉部材48上に形成した複合体の標識物を検出測定するもので、これら一連の作業はコンピュータによる自動制御によって行う。

30 【0055】図6に示す捕捉装置51は図5の捕捉装置41と基本的に同一で、捕捉装置541がシリンダ部材42に2つの開口部43, 44を有するに対し、捕捉装置51はシリンダ部材52には切換弁を有する開口部53が1つのみである点においてのみ捕捉装置41と相違している。すなわち、この捕捉装置51は開口部53の切換弁を切り換えることによってシリンダ部材52内に検体液を供給したり、シリンダ部材52から検体液を排出するもので、その他の操作は前記捕捉装置と同一である。なお、図中55はプランジャー、56はガイド部材、57は液通路、58は捕捉部材、59はCCDカメラを示す。

40 【0056】なお、この発明の液中の特定物質の捕捉方法及びその装置は、液中に微量でも特定物質が存在していれば、これを確実に捕捉部材上に捕捉、濃縮することができるので、検体液中に多くの特定物質の存在を必要

としない。したがって、たとえば、生体から得た一つの遺伝子や細菌を数個乃至十数個増幅されれば、当該遺伝子や細菌を検体液中から捕捉して検出測定することができる、従来のように検出測定のために遺伝子や細菌の増殖に要する時間を大幅に短縮させて効率的に検出測定を行うことができる。

【0057】

【発明の効果】この発明の液中の特定物質の捕捉方法は、微小断面で構成された液通路内に液を強制的に流通させ、該液通路内に配置した捕捉部材に液中の特定物質を結合させることによって液中に微量でも特定物質が含まれていれば、使用する液量が少なくとも高感度でこれを捕捉することができる。

【0058】特に、この発明の捕捉方法は、前記微小断面の液通路に設けられる小さな捕捉部材によって反応の場を小さくし、該捕捉部材に生ずる現象をミクロ的に観察することによって計測時間の短縮と使用する試薬の減少を図りながら $\mu\text{g}/\text{ml} \sim \text{pg}/\text{ml}$ の濃度範囲、特に $1\text{pg}/\text{ml}$ 以下の微量な物質を高感度で捉えることができる。

【0059】この発明の特定物質の捕捉装置は、シリンダ部材とプランジャー及びシリンダ部材内に装填するガイド部材と、該ガイド部材に装填する捕捉部材とから構成されたもので、捕捉部材には特定物質と結合する結合物質を担持させているので、プランジャーを操作して極小の液通路内に液を強制的に流通させ、この液を捕捉部材と接触させて液中の特定物質を捕捉部材に結合させて捕捉濃縮するので、液中に含まれる特定物質を高感度で確実に捕捉できる。

【0060】特に、この捕捉装置は、構成部材が少なくて、組立が容易で、操作も簡単かつ容易であるので实用性がきわめて高く、特定物質を捕捉反応させる捕捉部材が極小であるので、使用する試薬の量を従前の装置に比*

*して大幅に減少させ、安価なコストで確実かつ迅速に、極小の検体であっても検出を行うことができる。

【0061】この発明の特定物質の捕捉方法を利用した検出方法は、微小断面の液通路に特定物質を結合させる結合物質を担持した捕捉部材を配し、該捕捉部材によって特定物質を捕捉したのち、該特定物質と反応する標識された標識物質を捕捉部材に接触させて免疫複合体や2本鎖の核酸などを形成させ、この標識物を捕捉部材上で検出測定するので、短時間に高い計測感度で検出測定することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】この発明の捕捉装置の一例を示す一部切欠斜視図である。

【図2】図1に示す捕捉装置の縦断面図である。

【図3】この発明の捕捉装置の他の例を示す一部切欠斜視図である。

【図4】この発明の捕捉装置のさらに他の例を示す要部の縦断面図である。

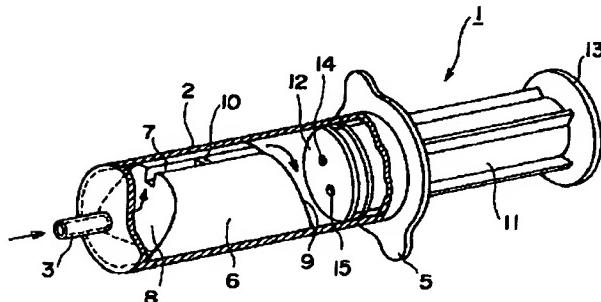
【図5】自動化のための捕捉装置の一例を示す概略説明図である。

【図6】自動化のための捕捉装置の他の例を示す概略説明図である。

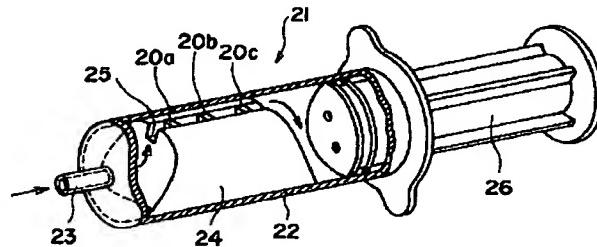
【符号の説明】

- | | |
|----|-----------|
| 1 | 検体の検出装置 |
| 2 | シリンダ |
| 3 | ノズル |
| 4 | 挿入部 |
| 7 | 液通路 |
| 10 | 捕捉部材 |
| 11 | プランジャー |
| 12 | プランジャーの頭部 |
| 13 | 洗浄液通路 |
| 14 | 標識液通路 |

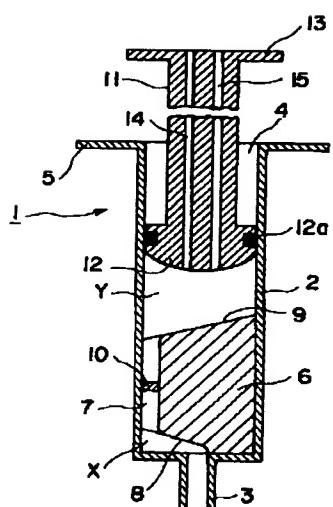
【図1】



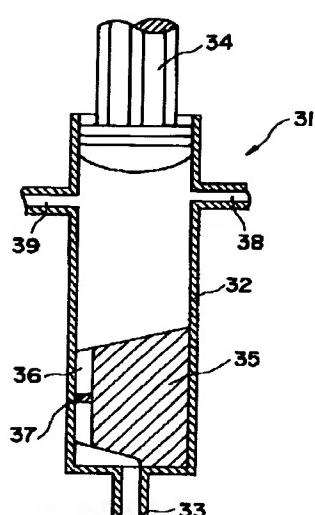
【図3】



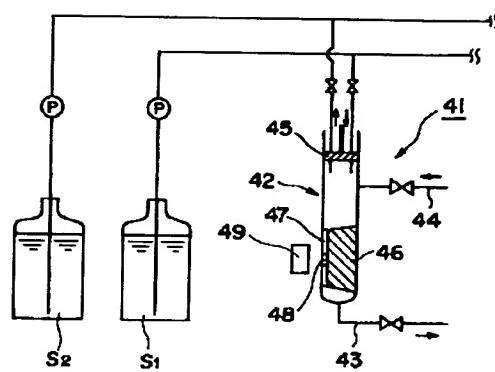
【図2】



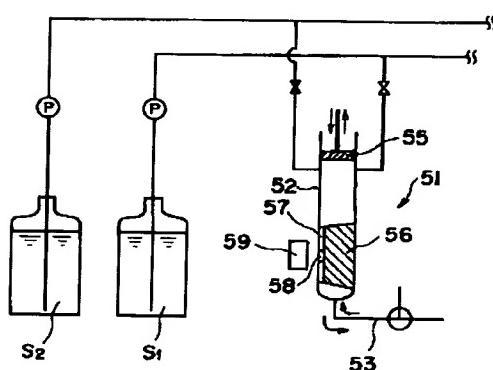
【図4】



【図5】



【図6】



フロントページの続き

(72)発明者 金井 雅弘

東京都墨田区業平5丁目1番12号 オーベ
クス株式会社内